

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	11	NUMERO	10 A 1
	21	FECHA DE PRESENTACION	

445.716

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES: 31 NUMERO	32 FECHA	33 PAIS
554.947	3 de marzo de 1.975	Norteamérica.

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07C	

64 TITULO DE LA INVENCION
Procedimiento para preparar N-acil-L-metionina ópticamente pura.-

71 SOLICITANTE (S)
The Procter & Gamble Company.-

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
301 East Sixth Street, Cincinnati, Ohio 45202, EE.UU. de A.

72 INVENTOR (ES)
Clyde Eugene Stauffer.-

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
Don Jaime Gómez-Acebo y Modet.-

El presente invento se refiere a un procedimiento para producir N-acil-L-metionina y L-metionina.

5. Hasta ahora se conoce el hecho de que la N-acil-D,L-metionina puede separarse en sus antípodos ópticos mediante su reacción con ciertas bases ópticamente activas, por ejemplo, treo-2-amino-(p-metilsulfonilfenil)-1,3-propanodiol, brucina; fenquilamina o lisina, y que las sales diastereoméricas pueden separarse una de otra basándose en sus diferentes propiedades físicas, especialmente en sus diferentes  
10. solubilidades (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 3.845.110 otorgada el 29 de octubre de 1974 a Fahrenstich y colaboradores). Sin embargo, dichas bases ópticamente activas son en sí mismas difíciles de obtenerse. Además, los  
15. procedimientos aludidos comúnmente no producen buenos rendimientos de la N-acil-L-metionina y de gran pureza.

Las enzimas que actúan de modo selectivo en derivados aminoácidos determinados se han empleado hasta ahora para suministrar aminoácidos ópticamente activos. Por ejemplo, la patente estadounidense 3.386.888, expedida el 4 de  
20. junio de 1968 a Chibata y colaboradores, describe que la L-metionina puede recuperarse por la acción de la acilasa sobre la N-acil-D,L-metionina. Empero, este método enzimático no es del todo conveniente. La acilasa que se emplea es costosa, la proporción a la cual se desarrolla la reacción es relativamente lenta y la enzima acilasa es inestable.  
25.

La acción del extracto de páncreas (que contiene una proteinasa de serina derivada de mamíferos) sobre el éster isopropílico de D,L-metionina puede deparar cuanto menos una resolución parcial de la metionina. Véanse, al efecto, los trabajos de Brenner y colaboradores en Helv. Chim.  
30.

5. Acta, Vol. 32, páginas 333-37 (1949) y de Wretlind en Acta Physiol. Scans., Vol. 20, página 1 (1950). Sin embargo, las enzimas derivadas de mamíferos son costosas y dichas publicaciones sugieren que no se obtiene una buena pureza óptica. Por lo tanto, las publicaciones de referencia no proponen un procedimiento comercial conveniente para producir L-metionina.

10. Se sabe que las proteinasas de serina derivadas de microbios, por ejemplo, las subtilisinas de Novo y Carlsberg, muestran grados variables de actividad de esterasa sobre diversos ésteres aminoácidos de N-acil-L. Véase, por ejemplo, el trabajo de Barel y colaboradores en The Jour. of Biolog. Chem., Vol. 243, páginas 1344-48 (1968) y de Morihara y colaboradores en Arch. Biochem. and Biophy., Vol. 129, páginas 620-633 (1969). Estas publicaciones muestran que las proteinasas de serina manifiestan una gran actividad de esterasa sobre algunos de dichos derivados aminoácidos, y poca o ninguna actividad de esterasa en otros, según el aminoácido de que se trate en particular.

15. Las publicaciones citadas no describen la actividad de las proteinasas de serina en los ésteres de la N-acil-L-metionina, ni la actividad de las proteinasas de serina en los ésteres racémicos del N-acil-D,L-aminoácido.

20.

25. Tanto la L-metionina como la N-C<sub>19</sub> acil-L-metionina son valiosos suplementos nutricionales, por lo que sería muy conveniente contar con un procedimiento más efectivo para obtener dichos compuestos nutricionalmente valiosos. Un procedimiento especialmente efectivo: (1) incluiría materiales fácilmente disponibles y económicos y (2) produciría un material de gran pureza, en alto rendimiento y en

30.

forma rápida.

5. El presente invento proporciona un procedimiento especialmente efectivo para obtener N-C<sub>1-9</sub> acil-L-metionina y L-metionina. En suma, el presente invento se refiere a un procedimiento para obtener la N-acil-L-metionina ópticamente pura, que consiste en: (1) someter el éster de N-acil-D,L-metionina a la acción de una enzima proteolítica seleccionada del grupo que consta de: (a) proteinasas de sulfidrilo y (b) proteinasas de serina derivadas de microbios y (2) separar la N-acil-L-metionina resultante. En otro aspecto del invento, el grupo N-acilo puede separarse químicamente para dar lugar a la L-metionina.

10. El presente invento se refiere a un procedimiento para producir la N-acil-L-metionina ópticamente pura, que consiste en: (1) someter el éster de N-acil-D,L-metionina a la acción de una enzima proteolítica seleccionada del grupo que consta de: (a) proteinasas de sulfidrilo y (b) proteinasas de serina derivadas de microbios; y (2) separar la N-acil-L-metionina resultante.

15. Tal como se emplea en la presente, la expresión "N-acil-L-metionina ópticamente pura" se refiere a la N-acil-L-metionina materialmente exenta del isómero D-.

20. Se ha descubierto que ciertas proteinasas de fácil disponibilidad, por ejemplo, las proteinasas de sulfidrilo y las proteinasas de serina derivadas de microbios muestran una gran actividad de esterasa en cuanto a los ésteres de N-acil-L-metionina, y muy poca actividad de esterasa por lo que se refiere a los ésteres de N-acil-D-metionina. Además, se ha encontrado que la gran actividad de esterasa manifestada en cuanto al isómero L-, no se

25.  
30.

5. inhibe por la presencia del isómero D-. Si el éster de N-acil-D,L-metionina se somete a la acción de dicha proteinasa resulta una mezcla del éster de N-acil-D-metionina y N-acil-L-metionina. La N-acil-L-metionina puede separarse con facilidad de la mezcla por dispositivos convencionales, por ejemplo, ajustando el pH de una mezcla acuosa y extrayendo con un disolvente organico como el cloroformo, el acetato de etilo o el acetato de butilo.

10. En este invento pueden emplearse varios compuestos específicos de éster de N-acil-D,L-metionina. Los compuestos que se prefieren deben contener los grupos acilo y éster que se mencionan más adelante.

15. De preferencia, el grupo acilo se deriva de ácidos grasos que contienen de 1 a 9 átomos de carbono. Más particularmente, el grupo N-acilo consiste en formilo, acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, caprilo, enantilo, caprilo o pelargonilo. El grupo éster puede derivar de una variedad de alcoholes que contienen de 1 a 10 y, de preferencia, de 1 a 6, átomos de carbono. Los ejemplos especialmente adecuados de grupos éster son los siguientes:

20. metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, butilo secundario o isobutilo. Los ejemplos apropiados en especial de grupos acilo son los siguientes: formilo, acetilo y propionilo. El éster metílico racémico de la N-acetil-D,L-metionina es el que mas se prefiere para usarse en el procedimiento del presente invento.

25. Las proteinasas de sulfidrilo adecuadas son, por ejemplo, papaína, ficina y bromelaina.

30. Las proteinasas de serina convenientes para utilizarse en este invento derivan de microorganismos como las

bacterias, los hongos y los mohos. Las proteinasas de serina derivadas de microbios son las que se prefieren en el procedimiento de este invento. Estas proteinasas son relativamente económicas y disponibles en el comercio.

5. Un ejemplo de proteinasas de serina preferibles en el presente invento son las que derivan del organismo bacteriano Bacillus subtilis y que se denominan subtilisinas.

10. Una subtilisina preferida en el presente invento es la cepa Carlsberg derivada del Bacillus subtilis. La cepa Carlsberg que se emplea conforme al presente invento es una cepa de subtilisina conocida, cuya secuencia de aminoácido se describe en el trabajo de Smith y colaboradores que aparece en "The Complete Amino Acid Sequence of Two Types of Subtilisin, BPN\* y Carlsberg", J. of Biol. Chen., volumen 241, 25 de diciembre de 1966, página 5974.

15. Esta cepa de subtilisina se caracteriza por tener una proporción aproximada de 13:1 entre la tirosina y el triptofano. La referencia anterior, que incluye una descripción de la secuencia de aminoácido de la subtilisina Carlsberg, se incorpora a la presente como referencia.

20.

25. Una subtilisina derivada del Bacillus subtilis y mutada por rayos X constituye otra subtilisina preferida del presente invento. Dicha mutación puede efectuarse, según la patente estadounidense 3.031.380 expedida el 24 de abril de 1962 a Minagawa y colaboradores, por la irradiación con rayos X de un organismo Bacillus subtilis. El tratamiento subsiguiente puede emplearse de una manera convencional para dar lugar a la preparación de un compuesto enzimático. La patente describe un procedimiento por el cual

30. se obtiene una composición enzimática, sometiendo el

- Bacillus subtilis a rayos X de una intensidad que corresponde materialmente a 24-50 roentgenios, durante un lapso mínimo de media hora, seleccionando de la colonia sometida a los rayos X una cepa que se identifica por células con características que consisten en estar exentas de pelo, resistentes, dentadas, manchadas y de un blanco opaco, separando dicha cepa y poniéndola en un medio de cultivo seleccionado del grupo que consta de salvado de trigo y harina de maíz, manteniendo el cultivo durante un lapso mínimo de 40 horas, mientras se aerea de un modo materialmente continuo, y secando el cultivo. La descripción de la patente estadounidense 3.031.380 se incorpora a la presente como referencia.
- Otros ejemplos de proteinasas de serina apropiadas para utilizarse en el presente invento incluyen a las siguientes: proteinasas de serina derivadas del Aspergillus oryzae. Los métodos para producir y separar estas enzimas derivadas de mohos son conocidos de los expertos en el ramo. Véase, por ejemplo, el trabajo de Subramanian y colaboradores, en *Biochemistry*, Vol. 3 No. 13, páginas 1861-74 (1964), y de Misaki y colaboradores en *Agr. Biol. Chem.* Vol. 34, No. 9, páginas 1383-92 (1970); proteínasa de serina derivada del Streptomyces griseus (ATCC 3463). Dichas proteinasas de serina se encuentran disponibles en el mercado con el nombre industrial "Pronasa" y son vendidas por la Kaken Chemical Co. de el Japón. Los métodos para obtener y separar las proteinasas son conocidas. Véase, por ejemplo, el artículo de Narahshi y colaboradores en *The Journal of Biochemistry*, Vo. 62, No. 6, páginas 633-41 (1967), proteínasa de serina derivada del Aspergillus
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.
- 30.

sydowi. Se conocen los métodos para producir y separar esta proteínasa de serina derivada de hongos. Véase, por ejemplo, el artículo de Danno y colaboradores en Agr. Biol. Chem., Vol. 31, No. 10, páginas 1151-58 (1967).

5. Otros ejemplos adecuados de proteinasas de serina derivadas de microbios son: la proteínasa alcalina de *Aspergillus* (E.C. 3.4.21.15), la endopeptidasa *Alternaria* (E.C. 3.4.21.16), la proteínasa de serina *Arthrobacter* (E.C. 3.4.21.17). Estas enzimas particulares se han identificado de acuerdo con una nomenclatura sistemática que incluye a un "número E.C.". Véase "Enzyme Nomenclature", de la Comisión de Nomenclatura Bioquímica, de Elsevier Publishing Company (1973), Tarjeta No. 73-78247 de la Biblioteca del Congreso de los Estados Unidos de América.

10. De manera muy adecuada, la acción de la enzima proteolítica sobre el éster de N-acil-D,L-metionina se desarrolla en un medio acuoso que se mantiene a un pH de 5 a 10, preferentemente de 7 a 8, y a una temperatura de 10 a 60°C. De preferencia, la temperatura se mantiene en la escala aproximada de 20 a 40°C.

15. A causa de la gran actividad selectiva de esterasa de las enzimas proteolíticas, que se emplean en particular en el presente invento, hacia el éster de N-acil-L-metionina, en mezclas de éster de N-acil-D,L-metionina, se requieren cantidades muy pequeñas de la enzima proteolítica para obtener rápidamente la N-acil-L-metionina.

20. Por ejemplo, se emplean soluciones acuosas que contienen de 0.0005% a 1.0%, por peso y, de preferencia, de 0.005% a 0.5%, por peso, de enzimas (las cantidades de enzima que se mencionan en la presente se refieren a una enzima cris-

25.

30.

talina pura).

5. Por lo general, la cantidad de la N-acil-D,L-metionina que se emplea es, cuando menos, del 5%, por peso de la solución acuosa. De preferencia, se utilizan cantidades más grandes, por ejemplo, cantidades que llegan a que sobrepasan la máxima solubilidad del éster de N-acil-D,L-metionina en el medio acuoso (pueden emplearse cantidades que excedan la solubilidad máxima, ya que el éster L es consumido por la acción de la enzima mientras más de él entra en solución).

10. La velocidad de la acción de la enzima sobre el material depende de la concentración de la enzima y del éster en la solución. A este respecto, el éster metílico de la N-acetil-D,L-metionina es sumamente apropiado, pues muestra una buena solubilidad en agua (alrededor del 20%, por peso, a un pH de 7,5 y a 25°C.).

15. En virtud de que el éster metílico de la N-acetil-D,L-metionina es un sustrato de éster que se prefiere en este invento, en el Ejemplo I se suministra una modalidad específica detallada del invento en la cual se emplea este material.

20. EJEMPLO I

Parte A. - Preparación del éster metílico de N-acetil-D,L-metionina

25. Cien gramos de D,L-metionina se mezclan con 500 ml de metanol que contienen 30 g de NaOH para formar una mezcla susceptible de agitarse. A esta mezcla se incorporan lentamente, y agitando, 1,5 equivalentes molares (basados en la D,L-metionina) de anhídrido acético. Esta mezcla se agita constantemente hasta que se convierte en una solución clara. La solución clara que resulta contiene N-acetil-D,L-

30.

metionina disuelta en metanol.

5. A esta solución se incorpora, agitando,  $H_2SO_4$  anhidro en cantidad suficiente para neutralizar el NaOH y volver la solución ligeramente ácida. En estas condiciones, la N-acetil-D,L-metionina se convierte en el éster metílico de N-acetil-D,L-metionina. El metanol y el acetato de metilo que quedan (que se forman por la reacción de ácido acético residual y anhídrido acético con NaOH) se separan calentando la mezcla al vacío. La mezcla remanente se combina con 10. cloroformo y se filtra para separar sales de sulfato de sodio. Enseguida, la solución de éster y cloroformo se lava con agua para separar las sales que hayan quedado. A continuación la solución resultante de éster y cloroformo se calienta al vacío para separar el cloroformo. El material que 15. resulta es el éster metílico de la N-acetil-D,L-metionina.

Parte B - Preparación de la N-acetil-L-metionina

Se forma una solución acuosa que contiene 20%, por peso, del éster metílico de N-acetil-D,L-metionina. El pH se ajusta a alrededor de 7.5 incorporando NaOH 1N. A 20. esta solución se incorpora lentamente 0.04%, por peso de la solución acuosa, de la subtilisina Carlsberg cristalina, que es una proteinasa de aerina disponible en el mercado con el nombre industrial "Alcalase". Durante la incorporación de la proteinasa, la solución se agita continuamente y el pH se mantiene constante por la incorporación 25. automática de NaOH 1N desde un titulador automático (el titulador es un Radiómetro fácilmente disponible del tipo pH-stat). Cuando ya no es necesaria otra incorporación de NaOH para mantener el pH, la reacción concluye (en este 30. caso, el tiempo fue de alrededor de 30 minutos).

La mezcla resultante de éster metílico de N-acetil-D-metionina y N-acetil-L-metionina se separa de la siguiente manera: la mezcla acuosa se eleva a un pH de 10-11 incorporándole NaOH. En seguida, esta mezcla acuosa se extrae con cloroformo, como sigue: a la mezcla se agrega un volumen igual de cloroformo. La mezcla que resulta se agita brevemente. A continuación, el cloroformo inmisible con agua se separa en una capa dispersa. Las capas de agua y cloroformo se separan en seguida. El procedimiento de extracción con cloroformo se repite por dos veces más.

Las capas separadas de cloroformo, que contienen éster metílico de N-acetil-D-metionina, se combinan. El cloroformo se separa calentando la solución de cloroformo al vacío. El éster metílico de N-acetil-D-metionina resultante puede incorporarse a un agua o un metanol que contenga NaOH, y se calienta durante un tiempo suficiente para racemizar el material de éster. El material D,L-resultante puede reciclar en seguida en el procedimiento.

La capa de agua, que contiene N-acetil-L-metionina, se acidifica incorporándole  $H_2SO_4$  para bajar el pH a 2 o menos. Esta agua acidificada se extrae después con cloroformo del modo siguiente: un volumen igual de cloroformo se agrega al agua acidificada y se agita brevemente. Se deja que el cloroformo se separe del agua para formar dos capas dispersas. La capa de cloroformo se separa de la capa de agua. Este procedimiento de extracción con cloroformo se repite por dos veces más.

Las capas separadas de cloroformo se combinan. En seguida, la solución clorofórmica se calienta moderadamente al vacío para separar el cloroformo. El producto

consiste en la N-acetil-L-metionina que tiene una pureza óptica mayor del 95%.

5. Aunque este ejemplo presenta un procedimiento completo para obtener la N-acetil-L-metionina, debe entenderse que los expertos en la técnica cuentan con una variedad de métodos disponibles para formar los ésteres de N-acil-D,L-metionina, y que hay numerosos métodos para separar las mezclas de éster de N-acil-D-metionina y N-acil-L-metionina.

10.

#### EJEMPLO II

15. Cuando en la Parte B del Ejemplo la proteinasa de serina que se emplea es la subtilisina BPN, BPN', o la proteinasa derivada del Aspergillus Oryzae, se obtienen resultados iguales o semejantes en cuanto a que la N-acetil-L-metionina se produce rápidamente, el éster metílico de la N-acetil-D-metionina no es afectado y los dos compuestos pueden separarse con facilidad para deparar la N-acetil-L-metionina ópticamente pura.

#### EJEMPLO III

20. Cuando en la Parte B del Ejemplo, el material éster D,L que se emplea es un éster metílico, etílico, propílico o isopropílico de N-formil-D,L-metionina; un éster etílico, propílico o isopropílico de N-acetil-D,L-metionina; un éster metílico, etílico, propílico o isopropílico de N-propionil-D,L-metionina, se obtienen resultados iguales o semejantes, ya que se obtiene una N-(formil, acetil o propionil) L-metionina ópticamente pura, la cual puede separarse del éster de N-(formil, acetil o propionil)-D-metionina.

25.

EJEMPLO IV

5. Cuando en el Ejemplo I, se emplean papaína o ficina, proteinasas de sulfidrilo, en lugar de la proteínasa de serina, se logran materialmente los mismos resultados, puesto que se produce la N-acetil-L-metionina ópticamente pura.


10. La N-acil-L-metionina que suministra el procedimiento del presente invento puede convertirse de una manera sencilla en L-metionina. Por ejemplo, puede tratarse a temperaturas elevadas con un ácido diluido; por ejemplo, puede disolverse en ácido clorhídrico 2N y esta solución se calienta durante un tiempo a una temperatura aproximada de 80 a 100°C.

15. La L-metionina es un artículo comercial conocido y útil; las N-C<sub>1-9</sub> acil-L-metioninas son especialmente útiles como suplementos de alimentos proteínicos deficientes en aminoácido de azufre, como se describe en la solicitud de patente estadounidense, Expediente No. 256.860, registrada el 25 de mayo de 1972, ahora concedida. Por esta razón, 20. la N-C<sub>1-9</sub> acil-L-metionina, especialmente la N-formil-L-metionina, la N-acetil-L-metionina y la N-propionil-L-metionina, son los productos preferidos del procedimiento del presente invento.

25. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

REIVINDICACIONES

30. 1.- Procedimiento para preparar N-acil-L-metionina



5. ópticamente pura, caracterizado porque comprende las etapas de: (1) someter una mezcla de éster de N-acil-L-metionina y éster de N-acil-D-metionina a la acción de una enzima proteolítica elegida del grupo consistente en proteinasas de serina derivadas microbiológicamente; y (2) separar la N-acil-L-metionina resultante del éster de N-acil-D-metionina sin reaccionar.

10. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el grupo acilo contiene de 1 a 9 átomos de carbono.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el grupo éster contiene de 1 a 10 átomos de carbono.


15. 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la enzima proteolítica es una proteinasa de serina derivada microbiológicamente que consiste en un miembro del grupo consistente en subtilisina Carlsberg y subtilisina BPN.

20. 5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la mezcla de éster de N-acil-L-metionina y éster de N-acil-D-metionina, comprende éster metílico de N-acetil-D,L-metionina.

25. 6.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el tratamiento con la enzima proteolítica se efectúa a un pH de 5 a 10.

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el tratamiento con la enzima proteolítica se efectúa a un pH de 7 a 8 y a una temperatura de 10 a 60°C aproximadamente.

30. 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, ca-



raacterizado porque la temperatura es de 20 a 40°C aproximadamente.

5. 9.- Procedimiento para preparar N-acil-L-metionina ópticamente pura, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 15 hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

THE PROCTER & GAMBLE COMPANY.-

J. M. PÉREZ ACEVEDO Y POMA  
C. de Madrid, 11. C. de Madrid, España

